

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500835

研究課題名(和文) 高血圧性心臓病の形成におよぼす脂質合成系転写因子 SREBP-1 の役割

研究課題名(英文) Role of SREBP-1 on the development of hypertensive heart disease

研究代表者

久賀 圭祐 (KUGA, Keisuke)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60241816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：脂質合成系転写因子SREBP-1の心臓における役割、特に高血圧性心臓病の形成に及ぼす影響を検討した。野生型およびSREBP-1ノックアウトマウス(KO)に対し、昇圧物質アンジオテンシンII(Ang II)を慢性投与すると、野生型では血管周囲の線維化が著明であるのに対し、KOマウスでは線維化が抑制されていた。心臓における遺伝子発現をマイクロアレイにより検討すると、野生型では細胞外マトリックス関連遺伝子群と炎症関連遺伝子群の発現変化が著明であり、これらの変化はKOマウスにおいて軽減していた。以上より、高血圧性心臓病に認められる心筋線維化の形成にSREBP-1が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the role of a transcription factor, SREBP-1, in the development of hypertensive heart disease. We continuously administrated the vasoconstrictive agent angiotensin II (Ang II) to the SREBP-1-knockout (KO) mice and wild type mice. The wild mice showed the marked fibrous changes around the coronary vasculature in the heart, whereas KO showed the slight changes. We analyzed the alteration of cardiac gene expression by DNA microarray system and confirmed by real-time RT-PCR. The gene groups for extracellular matrix and inflammatory chemokine and cytokine were significantly changed in the wild mice; however, those were suppressed in the KO mice. These findings suggest that SREBP-1 is involved in the development of fibrous changes seen in the hypertensive heart disease.

研究分野：循環器内科学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 応用健康科学

キーワード：高血圧 線維化 炎症反応 細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

高血圧は心臓血管疾患発症の促進因子であり、高血圧による心病変の形成抑制は健全な生活を営む上での重要な問題である。長期間にわたる高血圧の継続は、心臓肥大という現象を引き起こし、心筋細胞肥大と間質の線維化という特徴的な組織像をもたらす。最終的には心機能が低下し心不全に陥る。この一連の過程に、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の亢進が関与している。一方申請者らは、生活習慣病で問題となる脂肪毒性の成り立ちについて、脂質合成系転写調節因子 SREBP-1 (Sterol Responsive Element Binding Protein-1) が関与していることを肝臓・脾細胞・脂肪組織・腎臓などの諸臓器について明らかにしてきた。脂肪毒性が顕著な病態である NASH (Non-Alcoholic Steatohepatitis) では、肝実質細胞における脂肪沈着を主たる特徴に有するが、その他に間質領域の慢性炎症像と線維化を特徴とする緩徐進行性の炎症反応が関与する。高血圧性心病変では実質細胞の心筋細胞肥大以外に間質の線維化を特徴とし、このことから心病変の形成にも肝 NASH 同様の慢性炎症が関与し、二次的結果として線維化が生じてくるのではないかとの仮説が成り立つ。よって SREBP-1 の活性化は肝臓だけではなく高血圧性心病変の形成にも関与している可能性が考えられる。さらに、心不全進展に対する薬物治療として、慢性炎症に注目した治療法の報告はない。

2. 研究の目的

- (1) 高血圧性心病変のモデルとして慢性 Ang II 投与モデルを作製し、心機能障害が生じることを明らかにする。
- (2) 高血圧性心病変モデルにおける組織学的特徴を明らかにし、線維化病変が著明であることを明らかにする。
- (3) 高血圧性心病変において遺伝子発現に変化が認められるかを明らかにし、その変化の特徴を明らかにする。
- (4) 脂肪毒性が低下するモデルとして、SREBP-1 ノックアウト(KO)マウスを用い、野生型マウスと比較して上記の特徴についてどのような相違があるのかを明らかにする。

以上の点を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) Ang II は、浸透圧ミニポンプを用いて 14.4 mg/kg/day の用量で 2 週間投与した。投与 2 週間後に小動物用心臓超音波検査装置を用いて、心筋収縮能をはじめ心機能を測定した。心機能測定後、体重・心重量測定を行い、検体採取を行った。

- (2) 心臓検体を組織学的に評価した。Ang II 投与 2 週間後の標本をマッソントリクローム法にて染色し、対照群と比較した。心臓から抽出した total RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行い、どのような遺伝子群が特徴的に変化しているのかを解析した。特に炎症に関連するサイトカイン・ケモカインの遺伝子発現を網羅的に測定した。
- (3) 脂質合成系転写調節因子 SREBP-1 のノックアウトマウスを用い、(1)(2)と同様に、心臓超音波検査装置による心機能測定、DNA マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現を行った。

4. 研究成果

- (1) 心臓超音波検査装置による心機能測定を行ったところ、野生型マウスでの Ang II 投与群では同対照群に比べ左室収縮能は軽度ながら有意に低下していた。また、Ang II 投与群にて、左室壁厚の有意な増加が認められた。心機能測定後、心重力測定を行ったところ、Ang II 投与群にて、有意な心重量の増加が認められた。一方、SREBP-1-KO マウスでは、Ang II 投与によっても左室収縮能の低下は認められなかった。しかしながら、心重量については野生型と同様に KO マウスにおいても Ang II 投与により有意な心重量の増加が認められた。
- (2) マッソントリクローム染色にて、心臓の線維化を評価した。野生型の対照群に比べ Ang II 投与群では、血管周囲の線維化が著明であった。一方、SREBP-1-KO マウスでは、Ang II 投与による血管周囲の線維化は、著明に減弱していた。
- (3) 網羅的遺伝子発現を DNA マイクロアレイ解析により行った(後にリアルタイム RT-PCR により発現変化を確認した)。野生型において、Ang II を投与すると、炎症反応に関連する遺伝子発現、特に複数のケモカインおよびケモカイン受容体の発現が有意に上昇していた。また細胞外マトリックスの構成タンパク遺伝子の発現が複数増加していた。これは、血管周囲の線維化を反映しているものと考えられた。一方、SREBP-1-KO に Ang II を投与した群と投与しない群における心臓での遺伝子発現を検討すると、一部のケモカインおよびケモカイン受容体の発現変化は野生型の発現変化の程度よりも軽減しており、細胞外マトリックス関連遺伝子の発現変化の程度も軽度であった。以上より、SREBP-1-KO では、Ang II 投与による炎症反応とそれに引き続く線維化形成が軽減していることが遺伝子発現パターンからも明らかになった。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 19 件)

1. Doki K, Sekiguchi Y, Kuga K, Aonuma K, Kohda Y, Homma M. Stereoselective analysis of flecainide enantiomers using reversed-phase liquid chromatography for assessing CYP2D6 activity. *Biomed Chromatogr.* 2014; in press. (査読有) doi: 10.1002/bmc.3143.
2. Tajiri K, Sakai S, Kimura T, Machino-Ohtsuka T, Murakoshi N, Xu D, Wang Z, Sato A, Miyauchi T, Aonuma K. Endothelin receptor antagonist exacerbates autoimmune myocarditis in mice. *Life Sci.* 2014; in press. (査読有) doi: 10.1016/j.lfs.2014.01.007.
3. Homma S, Kimura T, Sakai S, Yanagi KI, Miyauchi Y, Aonuma K, Miyauchi T. Calcitonin gene-related peptide protects the myocardium from ischemia induced by endothelin-1: Intravital microscopic observation and ³¹P-MR spectroscopic studies. *Life Sci.* 2014; in press. (査読有) doi: 10.1016/j.lfs.2014.02.024.
4. Shimojo N, Jesmin S, Sakai S, Maeda S, Miyauchi T, Mizutani T, Aonuma K, Kawano S. Fish oil constituent eicosapentaenoic acid inhibits endothelin-induced cardiomyocyte hypertrophy via PPAR- α . *Life Sci.* 2014; in press. (査読有) doi: 10.1016/j.lfs.2014.04.025.
5. Sakai S, Shimojo N, Kimura T, Tajiri K, Maruyama H, Homma S, Kuga K, Mizutani T, Aonuma K, Miyauchi T. Involvement of peptidyl-prolyl isomerase Pin1 in the inhibitory effect of fluvastatin on endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Life Sci.* 2014; 102: 98-104. (査読有)
6. Wang Z, Sato A, Akiyama D, Kimura T, Tajiri K, Hoshi T, Sakai S, Koike A, Miyauchi T, Aonuma K. Clinical value of plasma pentraxin 3 levels for predicting cardiac troponin elevation after percutaneous coronary intervention. *Life Sci.* 2014; 95:40-44. (査読有)
7. Kawamura R, Seo Y, Ishizu T, Atsumi A, Yamamoto M, Machino-Ohtsuka T, Nakajima H, Sakai S, Tanaka YO, Minami M, Aonuma K. Feasibility of left ventricular volume measurements by three-dimensional speckle tracking echocardiography depends on image quality and degree of left ventricular enlargement: validation study with cardiac magnetic resonance imaging. *J Cardiol.* 2014; 63: 230-238. (査読有)
8. Nakakuki M, Kawano H, Notsu T, Imada K, Mizuguchi K, Shimano H. A novel processing system of sterol regulatory element-binding protein-1c regulated by polyunsaturated fatty acid. *J Biochem.* 2014;155: 301-313. (査読有)
9. Doki K, Homma M, Kuga K, Aonuma K, Kohda Y. SCN5A promoter haplotype affects the therapeutic range for serum flecainide concentration in Asian patients. *Pharmacogenet Genomics.* 2013; 23: 349-354. (査読有)
10. Tajiri K, Shimojo N, Sakai S, Machino-Ohtsuka T, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Tsujimura Y, Kimura T, Sato A, Yasutomi Y, Aonuma K. Pitavastatin regulates helper T-cell differentiation and ameliorates autoimmune myocarditis in mice. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013; 27: 413-424. (査読有)
11. Seto K, Uchida F, Baba O, Yamatoji M, Karube R, Warabi E, Sakai S, Hasegawa S, Yamagata K, Yanagawa T, Onizawa K, Miyoshi E, Shoda J, Bukawa H. Negative expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis. *Springerplus.* 2013; 2: 657. doi: 10.1186/2193-1801-2-657. (査読有)
12. Sakai S, Kimura T, Wang Z, Shimojo N, Maruyama H, Homma S, Kuga K, Yamaguchi I, Aonuma K, Miyauchi T. Endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy is partly regulated by transcription factor II-F interacting C-terminal domain phosphatase of RNA polymerase II. *Life Sci.* 2012;91:572-7. (査読有)
13. Miyauchi Y, Sakai S, Maeda S, Shimojo N, Watanabe S, Homma S, Kuga K, Aonuma K, Miyauchi T. Increased plasma levels of big-endothelin-2 and big-endothelin-3 in patients with end-stage renal disease. *Life Sci.* 2012;91:729-32. (査読有)
14. Tajiri K, Imanaka-Yoshida K, Matsubara A, Tsujimura Y, Hiroe M, Naka T, Shimojo N, Sakai S, Aonuma K, Yasutomi Y. Suppressor of cytokine signaling 1 DNA administration inhibits inflammatory and pathogenic responses in autoimmune myocarditis. *J Immunol.* 2012;189:2043-53. (査読有)
15. Sato A, Hiroe M, Akiyama D, Hikita H, Nozato T, Hoshi T, Kimura T, Wang Z, Sakai S, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Aonuma K. Prognostic value of serum tenascin-C levels on long-term outcome after acute myocardial infarction. *J Card Fail.* 2012;18:480-6. (査読有)

16. Shimano H. Novel qualitative aspects of tissue fatty acids related to metabolic regulation: lessons from Elovl6 knockout. Prog Lipid Res. 2012;51:267-71. (査読有)
17. Tajiri K, Maruyama H, Sato A, Shimojo N, Endo M, Aihara H, Kawano S, Watanabe S, Sakai S, Aonuma K. Prediction of Chronic Renal Insufficiency after Coronary Angiography by an Early Increase in Oxidative Stress and Decrease in Glomerular Filtration Rate. Circ J 2011; 75: 437-442. (査読有)
18. Kumadaki S, Karasawa T, Matsuzaka T, Ema M, Nakagawa Y, Nakakuki M, Saito R, Yahagi N, Iwasaki H, Sone H, Takekoshi K, Yatoh S, Kobayashi K, Takahashi A, Suzuki H, Takahashi S, Yamada N, Shimano H. Inhibition of ubiquitin ligase F-box and WD repeat domain-containing 7 α (Fbw7 α) causes hepatosteatosis through Krueppel-like factor 5 (KLF5)/peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 (PPAR γ 2) pathway but not SREBP-1c protein in mice. J Biol Chem. 2011;286:40835-46. (査読有)
19. Karasawa T, Takahashi A, Saito R, Sekiya M, Igarashi M, Iwasaki H, Miyahara S, Koyasu S, Nakagawa Y, Ishii K, Matsuzaka T, Kobayashi K, Yahagi N, Takekoshi K, Sone H, Yatoh S, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. Sterol regulatory element-binding protein-1 determines plasma remnant lipoproteins and accelerates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31:1788-95. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Sakai S, Warabi E, Kimura T, Miyauchi T, Aonuma K, Ishii T: Protective Activity to Oxidative Stress is Attenuated in Development of Angiotensin II-Induced Cardiac Fibrosis and Dysfunction. The 16th Society for Free Radical Research International Biennial Meeting 2012.9.8 (英国ロンドン)
2. Sakai S, Nakagawa N, Shimojo N, Kumura T, Tajiri K, Kuga K, Homma S, Miyauchi T, Aonuma K, Shimano H. Sterol regulatory element-binding protein-1 is involved in the development of angiotensin II-induced cardiac fibrosis. Basic Cardiovascular Sciences Conference 2012.7.24(米国ニューヨーク)
3. Sakai S, Nakagawa Y, Shimojo N, Kuga K, Homma S, Shimano H, Aonuma K: Involvement of Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 (SREBP-1) in

Angiotensin II-Induced Cardiac Injury via Chronic Inflammatory Responses 第76回 日本循環器学会総会・学術集会 2012.3.6(福岡)

4. Sakai S, Nakagawa Y, Shimojo N, Kuga K, Homma S, Miyauchi T, Shimano H, Aonuma K: Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1 Participates in the Development of Cardiac Injury via Chronic Inflammation. American Heart Association Scientific Sessions 2011.11.14(米国オランダ)
5. Sakai S, Nakagawa Y, Shimojo N, Yoshida K, Kimura T, Maruyama H, Homma S, Shimano H, Aonuma K: Slowly Progressed Inflammatory Responses May Contribute to the Angiotensin II-Induced Cardiac Dysfunction. 第75回 日本循環器学会総会・学術集会 2011.8.5(横浜)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久賀 圭祐 (KUGA, Keisuke)
 筑波大学・医学医療系・教授
 研究者番号：60241816

(2) 研究分担者

酒井 俊 (SAKAI, Satoshi)
 筑波大学・医学医療系・講師
 研究者番号：30282362

(3) 連携研究者

島野 仁 (SHIMANO, Hitoshi)
 筑波大学・医学医療系・教授
 研究者番号：20251241